

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 123—125, März 1971

Automatische Bestimmung von Enzymaktivitäten in tierischen Seren mit dem Reaction Rate Analyzer 8600

1. Mitteilung: Vergleiche der automatisierten mit der manuellen Methode an Transaminasen, Lactatdehydrogenase und LDH-Isoenzym (α -HBDH)¹⁾

Von H. GRÖTSCH und P. HAJDÚ

Farbwerke Hoechst AG, vormals Meister Lucius & Brüning

(Eingegangen am 30. Oktober 1970)

Enzymaktivitäten tierischer Seren wurden mit dem von der Fa. LKB Stockholm eingeführten Reaction Rate Analyzer 8600 einerseits und mit dem optisch-kinetischen UV-Test andererseits gemessen. Die untersuchten Tierspezies (Hund, Meerschweinchen, Kaninchen, Ratte, Schaf und Pute) wiesen einen extrem breiten Aktivitätsbereich auf: Aspartattransaminase von 0—200, Alanintransaminase von 0—65, Lactatdehydrogenase von 50—3000 und α -Hydroxybutyratdehydrogenase von 30—900 IE// Serum. Die Meßergebnisse der automatischen Analyse und des klassischen UV-Testes wurden mathematisch statistisch ausgewertet; sie zeigten, daß die Automation dieser enzymatischen Analysen ohne Bedenken möglich ist.

Automatic determination of enzyme activities in animal sera with Reaction Rate Analyzer 8600. 1. Comparison of automated and manual methods for transaminases, lactate dehydrogenase and LDH-isoenzyme (α -HBDH)¹⁾

Both the Reaction Rate Analyzer 8600 from LKB Stockholm and the optical-kinetic-UV test were used to determine the enzyme activities of animal sera. The animal species studied (dog, guinea pig, rabbit, rat, sheep and turkey) show a very wide range of activities: aspartate transaminase 0—200, alanine transaminase 0—65, lactate dehydrogenase 50—3000, α -hydroxybutyrate dehydrogenase 30 to 900 IU// serum. The results from the automated analysis and the classical UV test were evaluated statistically. The results showed that the automation of these enzymic analyses is eminently possible.

In den letzten Jahren sind die an die Laboratorien gestellten Anforderungen hinsichtlich Quantität und Qualität enzymatischer Analysen stetig gestiegen; so ist heute die Automation der enzymatischen Analyse dringend notwendig. Im folgenden wollen wir die an einem von der Fa. LKB Stockholm als Reaction Rate Analyzer 8600 eingeführten Gerät gesammelten Erfahrungen mitteilen.

Bisherige Erfahrungen im Gebrauch dieses Automaten erstrecken sich nur auf biologisches Material von Menschen. Es war daher erforderlich, durch eine Reihe vergleichender Untersuchungen an verschiedenen Tierspezies zu überprüfen, inwieweit die bisher von uns verwendete manuelle Standardmethode durch eine automatisierte zu ersetzen ist, zumal die Arbeitstemperatur des Automaten auf 35° eingestellt ist. Wir ermittelten unter strengster Qualitätskontrolle vergleichend die Enzymaktivitäten eines relativ heterogenen Tiermaterials.

Material und Methoden

Tiermaterial

Eine Differenzierung nach Geschlecht wurde nicht vorgenommen. Die Tiere standen zur Zeit der Blutentnahme nicht im akuten Versuch. Ratten (Wistar II, 200 g Gewicht), Meerschweinchen (Bastarde, 400 g Gewicht) und Kaninchen (gemischt-rassig, 2500 g Gewicht) wurden nach einer Quarantäne von drei Wochen verwendet. Sie erhielten in dieser Zeit das für die einzelnen

Spezies käufliche Altromin-Normalfutter ad libitum. Schafe (25—30 kg Gewicht) erhielten Schaf-Fertigfutter, Hunde (Beagle, 12 kg Gewicht) Trocken-Preßfutter REKH 8500 und die Puten (0,3—4 kg Gewicht, Mastputen Nicolas bb 06) Putenmast-Alleinfutter.

Da bei den Hunden, Schafen und Puten eine vorangegangene Behandlung bis 4 Wochen vor unserem Versuch nicht ausgeschlossen werden konnte, bzw. auch eine Untersuchung des Gesundheitszustandes (z. B. auf Würmer) nicht erfolgt war, können die in der Tabelle 1 angegebenen Werte keinesfalls als Normalwerte angesehen werden. Diese können erst nach Vorliegen einer weitaus größeren Zahl von Versuchsdaten erarbeitet werden, die Gegenstand weiterer Veröffentlichungen werden sollten.

Wir haben bewußt aus dem anfallenden Versuchsmaterial wahllos Serienbestimmungen durchgeführt, um die uns interessierenden Aktivitätsbereiche so breit wie möglich abzustecken, und um die Einsatzfähigkeit des Automaten für die künftige Routinearbeit zu erproben.

Die Blutentnahme erfolgte bei den einzelnen Tierspezies unterschiedlich. Während Ratten und Meerschweinchen orbital entblutet wurden, erfolgte die Abnahme bei Kaninchen und Puten durch Herzpunktion, bei Hunden und Schafen aus der Halsvene. Das abgenommene Blut ließen wir vor dem Zentrifugieren ohne Zusatz gerinnungshemmender Stoffe 60 Min. bei + 4° stehen. Die Blutproben wurden durchschnittlich 2 Min. in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert, das abgenommene Serum wurde zwei Minuten nachzentrifugiert.

Methoden

Reaction Rate Analyzer 8600

Das Gerät mißt in einer mit den üblichen Reagenzien verdünnten biologischen Flüssigkeit die Enzymkinetik nach automatischer Zugabe eines „Starters“. Die quantitative Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgt auch hier indirekt über die Messung der Absorptionsänderung von β -NADH, wobei die Reaktion während einer am Gerät vorwählbaren Zeit bei 340 nm registriert wird.

¹⁾ Enzyme: Aspartattransaminase (EC 2.6.1.1.), Alanintransaminase (EC 2.6.1.2.), Lactatdehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27), LDH-Isoenzym (HBDH, EC unbekannt).

Für Automaten sind seit längerer Zeit Reagenzien-Packungen verfügbar, die ein Reaktions-Substratgemisch und das „Starter“-Reagenz enthalten. Sie tragen zu einer wesentlichen Arbeitsvereinfachung bei, da für die Vorlage lediglich ein maschinell durchführbarer Verdünnungsvorgang benötigt wird. Man arbeitet in Polystyrol-Einwegküvetten, die jeweils in einem Zehner-Magazin in das Gerät eingegeben werden. Innerhalb von 15 Min. erreicht die auf 35° temperierte Küvette die Meßposition, wo unter Rühren die automatische Zugabe von Startreagenz, dessen Dosierung variierbar ist, erfolgt. Dabei wirkt sich die Ausstattung des Gerätes mit 2 Kanälen vorteilhaft aus; durch eine einfache Umschaltung ist sofort die Bestimmung eines weiteren Enzymes möglich, dessen Reaktion mit einem anderen Startreagenz ausgelöst wird (z. B. Lactatdehydrogenase und Aspartattransaminase).

Zu Beginn der Messung wird die Extinktion des Ansatzes automatisch auf 0 abgeglichen; so wird für die Registrierung der Reaktionskinetik die gesamte Papierbreite ausgenutzt. Der empfindlichere Bereich (0–0,05) schaltet während der Meßzeit automatisch auf den weniger empfindlichen Bereich (bis 0,20) um, wenn die Extinktionsänderung über 0,045 hinausläuft, man kann aber auch die gesamte Reaktion mit der unempfindlicheren Einstellung (0–0,2 Extinktion) registrieren.

Die Auswertung erfolgt wie üblich aus der Extinktionsänderung, die Tangente wird unter Verwendung einer vom Hersteller für die einzelnen Enzyme mitgelieferten Skala in IE// abgelesen, wobei auch der Temperaturfaktor von 35° berücksichtigt wurde.

Photometer

Eppendorf-Photometer mit Küvettenwechselautomatik, temperiert auf 25°, Registriereinrichtung.

Verdünnungsautomat

Dilumatik der Firma Braun Melsungen wurde zur Probenvorbereitung des Automaten eingesetzt.

Enzymbestimmungen

Die Enzymkinetik der Transaminasen wurde mit 50 µl Serum in einem Gesamtvolumen von 2,000 ml nach KARMEN gemessen.

Zur Vorbereitung des Ansatzes dienten Marburg-Pipetten. Zur Messung im LKB-Automaten wurden 200 µl Serum mit 1000 µl Reaktionslösung verdünnt und die Reaktion mit 50 µl Startreagenz ausgelöst. Für die Messung der Enzymkinetik von Lactatdehydrogenase wurde sowohl manuell als auch automatisch 50 µl Serum mit 1250 µl Reaktionsgemisch verdünnt und die Reaktion mit 50 µl Startreagenz ausgelöst.

Das Lactatdehydrogenase-Isoenzym wurde nur im Enzymautomaten bestimmt.

Reagenzien

Für den Automatenbetrieb haben wir Automatenpackungen²⁾, für den optischen Test die üblichen UV-Testpackungen der Fa. Boehringer Mannheim GmbH verwendet.

Auswertung

Die Auswertung der Aktivitäten erfolgte bei Methode 1 durch Ermittlung des ΔE aus Vorlauf und Hauptlauf, bei Methode 2 wie vorher beschrieben.

Ergebnisse und Diskussion

Die Versuchsergebnisse aus beiden Methoden wurden gegenübergestellt und in Tabelle 1 zusammengefaßt. Korreliert wurden die jeweils aus Eppendorf-Photometer und LKB-Automat erhaltenen Werte unter Verwendung des Tischrechners Combitron S der Fa. Diehl Nürnberg.

Die Übereinstimmung ist als gut bis ausgezeichnet zu bezeichnen, da aus menschlichem Serum kaum ein derart breiter Aktivitätsbereich für eine Korrelation verfügbar ist.

²⁾ Herrn Dipl.-Chem. DIERZ, Fa. Boehringer Mannheim sei an dieser Stelle für die freundliche Überlassung der Versuchspackungen gedankt.

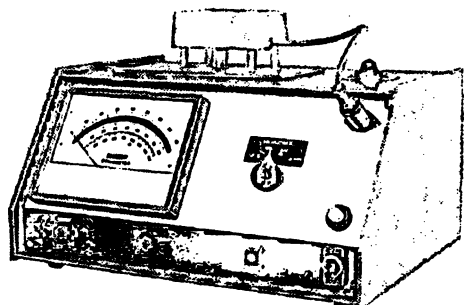
Tab. 1
Vergleichende Aktivitätsbestimmungen mit dem LKB Reaction Rate Analyzer 8600 und Eppendorf Küvetten-Wechselautomat

Tierart	n	Bereich IE/l	Korrelationskoeffizient	Regressionsgerade	Streuung IE/l	Streuung relativ*)
Aspartattransaminase (IE/l)						
Hund	35	10–30	0,955	0,893 + 1,50	± 1,17	7,5%
Meerschweinchen	23	20–140	0,990	0,914 + 3,95	± 3,16	7,1%
Kaninchen	19	2–15	0,861	0,948 + 0,91	± 1,72	20,3%
Ratte	24	50–70	0,994	1,038 – 2,95	± 1,13	1,8%
Schaf	27	30–140	0,991	0,849 + 5,2	± 3,55	5,2%
Pute	36	80–200	0,973	0,948 + 5,4	± 6,28	5,4%
Alanintransaminase (IE/l)						
Hund	37	10–65	0,992	1,024 – 0,37	± 1,19	7,9%
Meerschweinchen	24	10–30	0,958	1,249 – 3,14	± 1,73	10,0%
Kaninchen	19	6–20	0,827	0,658 + 2,6	± 1,54	12,2%
Ratte	24	10–14	0,990	1,034 – 0,55	± 0,89	5,5%
Schaf	28	0–6	0,880	0,961 – 0,33	± 1,18	28,7%
Pute	25	0–4	1,000	1,030 ± 0	± 0,65	49,2%
Lactatdehydrogenase (IE/l)						
Hund	14	80–180	0,989	0,997 – 5,8	± 5,7	6,3%
Meerschweinchen	18	200–600	0,978	0,926 + 3,6	± 27,0	7,4%
Kaninchen	16	100–450	0,967	0,863 + 7,2	± 16,7	7,3%
Ratte (normal gefüttert)	13	300–800	0,974	1,025 – 42,4	± 37,9	7,9%
Ratte (24 Std. Hunger)	15	1000–3000	0,989	1,012 + 11,7	± 89,2	5,4%
Schaf	16	400–1000	0,940	0,822 + 100,1	± 40,1	6,4%
Pute	20	400–700	0,977	0,969 + 17,6	± 24,4	4,7%
α -Hydroxybutyratdehydrogenase (IE/l)						
			Quotient $\frac{LDH}{HBDH}$			
Hund	14	30–80	2,64 ± 0,72			
Meerschweinchen	18	100–250	2,39 ± 0,13			
Kaninchen	16	130–400	1,53 ± 0,12			
Ratte (normal gefüttert)	13	100–300	3,36 ± 0,29			
Ratte (24 Std. Hunger)	15	200–900	3,36 ± 0,24			
Schaf	16	200–700	1,65 ± 0,11			
Pute	20	200–400	2,06 ± 0,09			

*) Bezogen auf die Mittelwerte der untersuchten Aktivitäten.

KNAUER

ELEKTRONISCHES HALBMIKRO-OSMOMETER



zur direkten Bestimmung der Osmolalität aller Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Urin, Liquor durch Gefrierpunkt-messung.

Kontrolle der Nierenfunktion

Kontrolle von iso-, hyper- und hypotonischen Lösungen

Prüfung von Infusionslösungen

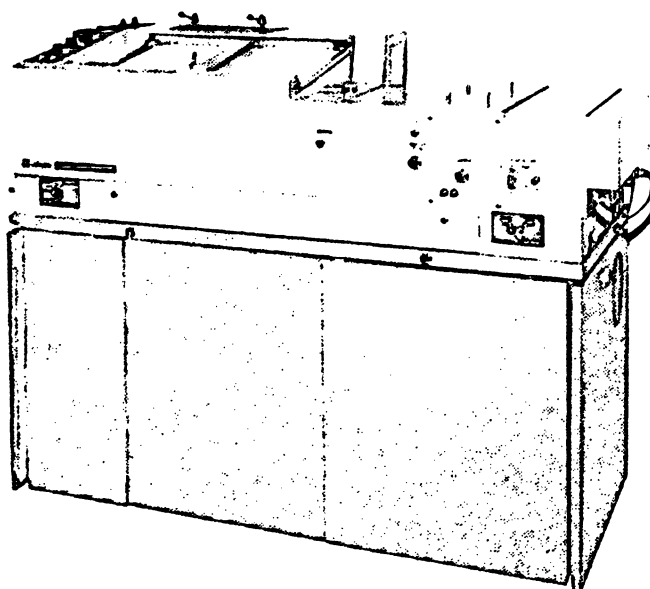
- Probevolumen nur 0,15 ml oder 0,05 ml
- Betriebsbereitschaft sofort nach dem Einschalten
- Dauer einer Messung ca. 2 Minuten
- Meßgenauigkeit 1—2 Milliosmol/kg bzw. 1‰
- Preis DM 3600,— + MWSt
- Lieferung ab Lager oder laufenden Serien

Weitere Spezialität: Komplettes System zur Molekulargewichtsbestimmung zwischen 100 und 1000000 durch Kryoskopie, Dampfdruck-Osmometrie und Membran-Osmometrie.

Wissenschaftlicher Gerätebau

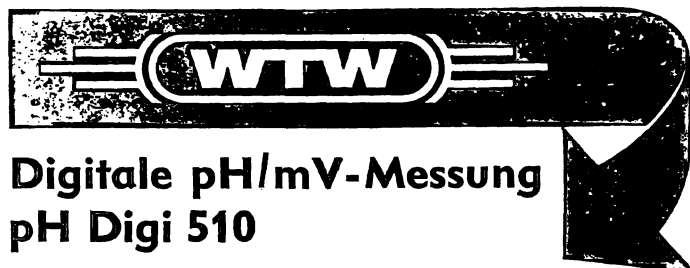
KG Dr.-Ing. Herbert Knauer & Co. GmbH,
1 Berlin 37 (West), Holstweg 18, Tel. (0311) 84 87 05

Undurchsichtige biologische Proben
können in vivo gemessen werden!



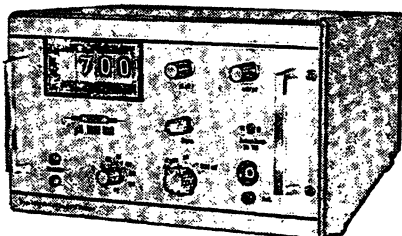
Shimadzu

Seisakusho LTD., Kyoto/Japan



- Bereich pH 0,00 — 14,00 / ± 1999 mV
- Genauigkeit $\pm 0,01$ pH / ± 1 mV
- irrtumsfreie Ablesung
- angemessener Preis

Temp. Kompensation
manuell
oder automatisch,
Schreiber Ausgang,
Messung aller Potentiale,
auch ionensensitiv.



Fordern Sie
Prospekte über unser Gesamtprogramm an!
Bei Ihrem Fachhändler oder direkt bei uns!

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH
Dr. hab. K. Slevogt · 812 Weilheim · Tel. (0881) 26 38/27 84

Büros: 43 Essen, K. Akemann, Lönsberg 22, Tel.: (021 41) 51 00 19
7407 Dusslingen b. Tübingen, W. Bohn, Farrenbergweg 5,
Tel.: (071 28) 78 09
58 Hagen, H. Duckstein, Hestertstraße 64, Tel.: (023 31) 4 58 57
635 Bad Nauheim, H. Ballauff, Frankfurter Straße 39, Tel.: (060 32) 48 60

SHIMADZU registrierendes Mehrzweck-Spektralphotometer Modell MPS-50 L

190 — 2500 nm, Zweistrahl-System,
konstante 100 % - Linie, End-On-Photomultiplier,
vielfache Bereichsspreizung

kombinierbar mit Zubehör für die:

Dünnschicht-Chromatographie, Tieftemperatur-,
Fluoreszenz-, Derivative-, Mikro-, Reflexions-
und Cross-Illumination-Spektralphotometrie.

Bitte fordern Sie Unterlagen an!

Außerdem informieren wir Sie gern
über weitere Spektralphotometer,
Refraktometer, Spektrographen,
DTA-Geräte, und Gas-Chromatographen.



Shimadzu (Europa) GmbH

4000 Düsseldorf — Königsallee 48
Telefon (0211) 32 01 75 — Telex 08 581 377



Sigma bietet mit Freude an:

Bestecks und Reagenzien für

PKU

Phenylketonurie-Untersuchungen

Die Phenylketonurie ist ein genetischer Defekt, der den Patienten am normalen Stoffwechsel des Phenylalanins hindert. Infolgedessen kommt es zur Anhäufung von Phenylalanin im Blut und zu einer Hirnschädigung. Es wird für möglich gehalten, daß die Hirnschädigung durch Frühdiagnose der PKU bei Geburt vermieden werden kann (1).

Sigma bietet zwei Verfahren zur Hilfe bei der Frühdiagnose der PKU an:

BESTIMMUNG VON PHENYLALANIN in Vollblut oder anderen Flüssigkeiten

1. Mikrobiologischer Suchtest — nach Sigma Technical Bulletin No. 160.

Diese halbquantitative Methode basiert auf dem Hemmtest von Guthrie. Dieser Test soll sich bei Massen-Screening-Programmen an neugeborenen Kindern bewährt haben; er ist von möglicher Bedeutung als Suchtest auf mütterliche PKU (2). Der Test ist einfach durchzuführen. Man benötigt außer einem Brutschrank keine Ausrüstung.

Besteck-Nr.	Maximal mögliche Bestimmungen	Preis
160 A	48	\$ 5,00
160 B	240	\$ 24,00

2. Quantitativer Test — nach Sigma Technical Bulletin No. 60-F.

Diese einfache und genaue fluorimetrische Methode für die quantitative Bestimmung von Phenylalanin basiert auf der Methode von McCaman und Robins (Fluorometer erforderlich).

Besteck-Nr.	Maximal mögliche Bestimmungen	Preis
60 M	80	\$ 7,70
60	250	\$ 12,25

BESTIMMUNG VON TYROSIN

in Serum und anderen Flüssigkeiten nach Sigma Technical Bulletin No. 70-F.

Diese fluorimetrische Methode basiert auf der Methode von Wong, Flynn und Inouye. Beim unreifen Neugeborenen kann der erhöhte Serum-Phenylalanin-Spiegel nur temporärer Natur sein. Die Bestimmung des Serum-Tyrosin-Spiegels kann wertvolle zusätzliche diagnostische Information geben (3).

Besteck-Nr.	Maximal mögliche Bestimmungen	Preis
70	150	\$ 6,50

Technical Bulletins No. 160, 60-F und 70-F sind auf Anfrage für interessierte Laboratorien gratis erhältlich.

Literatur: (1) Knox, W. E., Pediatrics 26, 1 (1960)

(2) Guthrie, R. u. A. Susi, Pediatrics 32, 338 (1963)

(3) Hsia, D. Y., L. Litwack, M. O'Flynn u. S. Jacovic, N. Engl. J. Med. 267, 1067 (1962)

Sigma-Reagenzien sind in der ganzen Welt durch den Fachhandel oder direkt aus St. Louis beziehbar.

Telegramme: SIGMACHEM, St. Louis, Missouri

Die Forschungslaboratorien von

SIGMA  **CHEMICAL COMPANY**

MAILING ADDRESS: P.O. BOX 14508, ST. LOUIS, MO., 63178, U.S.A.

MANUFACTURERS OF THE FINEST BIOCHEMICALS AVAILABLE

Vertretung in England:

SIGMA LONDON Chem. Co. Ltd. • 12, Lattice St., London S. W. 6 ENG. • Telephone: RENown-5823 (Rückberechnung)

Tab. 2
Qualitätskontrolle des LKB Reaction Rate Analyzers

IE/l	Precinorm E 901 ABC	Precipath E 001 A	Enzotrol 235 A, B
Aspartattransaminase			
Sollwert	42,1	116	35
Istwert	41,0 ± 2,8*)	114,1 ± 6,9	34,6 ± 3,1
	n = 44 V = 0,069	n = 34 V = 0,061	n = 13 V = 0,090
Alanintransaminase			
Sollwert	33,3	110	30
Istwert	36,8 ± 2,0	111,6 ± 5,6	28,2 ± 2,6
	n = 28 V = 0,054	n = 28 V = 0,050	n = 25 V = 0,092
Lactatdehydrogenase			
Sollwert	187	364	463
Istwert	201 ± 17	375 ± 28	501 ± 26
	n = 38 V = 0,084	n = 29 V = 0,075	n = 14 V = 0,053
α-Hydroxybutyratdehydrogenase			
Sollwert	142	267	fehlt
Istwert	145 ± 7	266 ± 15	280 ± 25
	n = 18 V = 0,048	n = 11 V = 0,057	n = 12 V = 0,091

*) ± 1 s.

Wiedergefunden 102 ± 5% der Sollwerte.

Die absolut niedrigen Aktivitäten von Kaninchen für Aspartattransaminase, Schaf und Pute für Alanintransaminase ausgenommen, liegt der Durchschnitt der Streuung unter 7% relativ.

Zur Qualitätskontrolle des Automatenbetriebes wurden die den Automatenpackungen beigegebenen Kontrollseren Boehringer 901 ABC und 001 A sowie Enzotrol (Lot Nr. ET 235 A, B, Asid Institut GmbH, München) an jedem Untersuchungstag in Mehrfachbestimmungen verwendet. Die Richtigkeit der mit dem Automaten erhaltenen Ergebnisse wird mit dem Mittelwert \bar{x} , die Präzision mit der Standardabweichung s und dem Variationskoeffizienten V in der Tabelle 2 dargestellt. Aus der Tabelle ist zu entnehmen, daß bei einer befriedigenden Richtigkeit die Variationskoeffizienten bei $6,5 \pm 1,5\%$ liegen.

Aus diesen Ergebnissen kann bei unserem Tiermaterial die Schlußfolgerung gezogen werden, daß eine Um-

stellung des einfachen, manuell durchgeführten optischen Tests auf den LKB Reaction Rate Analyzer ohne Bedenken möglich ist.

Nach unseren bisherigen Erfahrungen liegen die überzeugendsten Vorteile zwischen diesem Automaten und der „Handmethode“

1. in einer um Faktor 3—4 erhöhten Zahl durchführbarer Analysen;
2. in einer wesentlichen Personalsparnis, da die Seren in großer Anzahl auf einmal vorbereitet werden können, indessen die Maschine schon läuft;
3. in einem raschen und zuverlässigen Arbeiten durch die Verwendung von Automatenpackungen in Verbindung mit Verdünnungsmaschinen,
4. in einer bequemerem, schnelleren und vor allem genaueren Erstellung der einzelnen Meßergebnisse mit der Möglichkeit des digitalen Ausdrucks.

Dr. P. Hajdú
Farbwerke Hoechst AG
623 Frankfurt/M 80
Gebäude 821